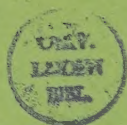


CHARAKTERISIERUNG
EINES LEUKOZYTEN-ANTIGENS
BEIM HAUSHUHN

Stephen Tobin

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

CHARAKTERISIERUNG EINES LEUKOZYTEN-ANTIGENS BEIM HAUSHUHN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
STEPHEN TOBIN
aus
Los Angeles, USA

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung und Literatur	1
1.1.	Problemstellung	9
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Aufarbeitung der Membranen peripherer Blutlymphozyten	10
2.2.	Präparation der Bursa- und Thymus-Zellmembranen	12
2.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	13
2.4.	Blotting	17
2.5.	Immunenzymatischer Nachweis	21
2.6.	Molekulargewichtbestimmung der Polypeptide	24
2.7.	Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony	25
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Molekulargewicht des mit CL-1 reagierenden PBL-Antigens	27
3.2.	Thymus- und Bursa-Membran-Präparationen	27
3.3.	Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony	32
4.	Discussion	34
5.	Zusammenfassung	47
6.	Summary	48
7.	Literaturverzeichnis	49

Abkürzungen

AEV	Avian Erythroblastosis Virus
AMW	Apparent Molecular Weight
cDNA	komplementäre DNS
CL-1	Chicken Leukocyte-1 monoklonaler Antikörper
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL-2	Interleukin-2
kd	kilodalton
LCA	Leukocyte Common Antigen
MG	Molekulargewicht
NK	Natural Killer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyäthylenglykol
PER	Ammoniumperoxodisulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TK	Thymidinkinase

Charakterisierung eines Leukozyten-Antigens beim Haushund

1.EINLEITUNG

Das Immunsystem von höheren Wirbeltieren hat zwei Komponenten, eine spezifische und eine unspezifische. Für die spezifische Immunität sind Lymphozyten verantwortlich, die zunächst durch Kontakt mit einem Antigen aktiviert werden müssen. Es gibt zwei Klassen von Lymphozyten: B- und T-Zellen. B-Zellen sind Lymphozyten die zur Reifung die Bursa Passiert, bzw ein Bursaäquivalent bei Säugern durchlaufen und als Reaktion auf Antigenkontakt Immunglobuline bilden. Es gibt bei Vögeln drei Klassen von Immunglobulinen: IgM, IgG, und IgA.

T-Zellen sind Lymphozyten die während ihrer Reifung und Differenzierung den Thymus durchlaufen. Sie können entsprechend ihrer Funktion in drei Subpopulationen eingeteilt werden: T-Helfer Zellen, T-Suppressor Zellen, und zytotoxische T-Lymphozyten. Die Unterscheidung zwischen den verschiedenen T-Zellsubpopulationen war bisher schwierig. Auf zellulärer Ebene müssen Struktur und Funktion eng zusammenhängen, so daß verschiedene Forscher versucht haben die T-Zellsubpopulatio-

nen durch immunologische Methoden zu unterscheiden, insbesondere durch spezifische Antisera gegen bestimmte Zellsubpopulationen. Die Ergebnisse waren nicht immer befriedigend, obwohl Teilerfolge erzielt wurden.

Aus dem Speziespotential werden bei der Immunantwort eines Individuums nur einige Antikörpertypen gebildet, die eine Zufallsauswahl aus der Gesamtheit darstellen. Somit ist es unmöglich, in unterschiedlichen Individuen gegen eine einzelne Determinante Antiseren, die in ihrer Antikörperzusammensetzung identisch sind, herzustellen. Bei der Immunantwort auf ein komplexes Antigen, wie z.B. xenogene Zellen, werden viele verschiedene Zelloberflächenantigene, die jeweils mehrere Determinanten tragen, erkannt. In Kombination mit der Zufallsauswahl der Antikörpertypen gegen eine einzelne Determinante aus dem Gesamtrepertoire führt das dazu, daß die qualitative Zusammensetzung der Antiseren von zwei Individuen mehr oder weniger stark voneinander abweichen muß. Eine Reproduktion der Kombination der Antikörpertypen, die von einem Tier gebildet werden, in einem anderen Individuum ist also nicht möglich, was eine Standardisierung sehr erschwert.

Sollen Antiseren gegen einzelne Determinanten von xenogenen Zellen spezifisch gemacht werden, so sind material- und zeit-aufwendige Absorptionsschritte notwendig, und im Endeffekt ist der Titer solcher Antiseren oft sehr gering.

Alle diese Nachteile konventioneller Antiseren können durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, die gegen eine einzelne Determinante gerichtet sind und von permanent wachsenden Zelllinien produziert werden, ausgeschaltet werden. Köhler und Milstein (1975) gelang es, die relativ kurzlebigen antikörperproduzierenden Lymphozyten mit permanent wachsenden Plasmazytomzellen zu fusionieren. Damit war die Möglichkeit eröffnet, permanent kultivierbare, theoretisch unsterbliche Hybridzellklone zu selektieren, die kontinuierlich Antikörper produzieren. Die von solchen Hybridomen produzierten monoklonalen Antikörper sind molekular einheitlich und besitzen die gleiche Spezifität.

Die ersten Lymphozytenfusionen wurden durch Behandlung der Zellen mit Sendai-Virus induziert (Köhler und Milstein, 1975). Durch die Einführung von Polyethylenglykol (PEG) als fusionsförderndes Agens konnte eine wesentlich höhere Fusionsfrequenz erzielt werden (Galfre et al., 1977).



Während die nichtfusionierten Lymphozyten einige Tage nach der Zellfusion in der Zellkultur absterben, gelingt die Abtrennung der nichtfusionierten Plasmazytomzellen von den Hybridzellen nur durch den Einsatz des Littlefieldschen HAT-Selektionssystems (1964). Voraussetzung für die Verwendung der HAT-Selektion sind Plasmazytomzellvarianten, die Defekte in dem Enzymen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) oder Thymidinkinase (TK) aufweisen. Solche Zelllinien sterben in Kulturmedium, dem Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) zugesetzt wird, ab, da sie den Aminopterin-Block des Hauptsyntheseweges der DNA durch Verarbeitung von Hypoxanthin und Thymidin nicht umgehen können.

Nur Hybridzellen zwischen HGPRT- oder TK-negativen Plasmazytomzellen und normalen Lymphozyten (HGPRT- und TK-positiv) können in HAT-Medium wachsen, weil die Plasmazytomzellen die Fähigkeit zu permanentem Wachstum und die Lymphozyten die HGPRT- und TK-Aktivität zur Überwindung des Aminopterin-Blocks beisteuern.

Unter den aufwachsenden HAT-resistenten Hybridzellklonen müssen dann diejenigen bestimmt und selektiert werden, die Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren. Etablierte Antikörperproduzierende Hybridzellklone (Hybridome) können sowohl in vitro als auch in vivo kultiviert und die monoklonalen Antikörper aus Zellkulturüberstand oder aus der Aszitesflüssigkeit gewonnen werden.

Artspezifisch gegen Hühner-T- oder -B-Lymphozyten reagierende Xenoantisera wurden durch verschiedene Forscher hergestellt (Forget et al., 1970; McArthur et al., 1971; Ivanyi und Lydyard, 1972; Malchow et al., 1972; Hudson und Roilt, 1973; Wick et al., 1973; Isakovic et al., 1975; Gilmour et al., 1976; Grebenau et al., 1976; Sugimoto et al., 1977; Boyd und Ward, 1978; Jotereau et al., 1980; Fredericksen und Gilmour, 1981; Pink et al., 1981; Traill et al., 1984). Diese Seren waren wichtig, um Ontogenese und Funktion der Lymphozyten zu studieren. Jedoch war nichts bekannt über die Struktur der Antigene die mit diesen Antiseren reagierten.

Peault et al.(1982) produzierten einen monoklonalen Antikörper der mit kortikalen Thymozyten von Wachteln reagierte, aber nicht mit peripheren T-Zellen und 1983 einen anderen monoklonalen Antikörper gegen hämatopoetische Zellen nach Immunisation mit der schweren Kette vom Wachtel-IgM.

Kornfeld et al.(1983) produzierten 11 verschiedene monoklonale Antikörper gegen hämatopoetische Zellen von Hühnern:

- I. 4 monoklonale Antikörper, spezifisch für myeloide Zellen, reagierten vorwiegend mit unreifen myeloiden Zellen.
- II. 1 monoklonaler Antikörper reagierte mit myeloiden und T-lymphoiden Zellen.
- III. 4 monoklonale Antikörper reagierten mit myeloiden, erythroiden und T-lymphoiden Zellen.
- IV. 1 monoklonaler Antikörper reagierte mit myeloiden und T- und B-lymphoiden Zellen.
- V. 1 monoklonaler Antikörper reagierte mit allen hämatopoetischen Zellen von Hühnern außer Erythrozyten.

Pink und Rijnbeek (1983) produzierten unter Verwendung von Hühner-Thymus- oder -Bursa-Zellen folgende vier monoklonale Antikörper:

- I. IgM X.14 reagierte nur mit kortikalen Thymuszellen und präzipitierte Antigen mit MG 65kd, 125kd, und 180kd.
- II. IgG₁ L.17 reagierte sowohl mit bursa- als auch thymusabhängigen Lymphozyten, jedoch mit Glykoproteinen verschiedenen Molekulargewichts (MG 210kd bzw 180kd).
- III. IgG₁ L.22 reagierte mit einem Protein mit MG 70kd, welches an bursaabhängigen Zellen von verschiedenen, jedoch nicht allen Hühnerlinien zu finden war.
- IV. IgG_{2b} L.43 reagierte mit bursaabhängigen Zellen, Makrophagen und Fibroblasten, nicht jedoch mit T-Lymphozyten, und präzipitierte Antigen mit MG 23kd von Bursazellen.

Chen et al. (1984) produzierten 2 monoklonale Antikörper gegen Hühner-Thymuszellen, welche mit Glykoproteinen mit MG 63kd und 103kd reagierten. Vom 12. bis zum 15. Tag der Bebrütung erhöhte sich der Prozentsatz reagierender Thymuszellen von 6% auf über 90%; andere hämatopoetische Zellen reagierten dagegen kaum. Einer der monoklonalen Antikörper reagierte auch mit kortikalen Thymuszellen von Wachteln.

Houssaint et al. (1985) produzierten einen monoklonalen Antikörper, welcher mit 80% Hühner-Thymuszellen, 20% Milz-Leukozyten, 10% Blut-Leukozyten und 8% Knochenmarkzellen reagierte, aber mit weniger als 1% Bursa-Zellen.

1.1. PROBLEMSTELLUNG

Im hiesigen Labor wurde eine Reihe von monoklonalen Antikörpern unter Benutzung von Thymuszellen und peripheren Blutlymphozyten des Huhnes als Antigen produziert. In diesem Labor beschäftigt man sich hauptsächlich mit immunologischen Studien am Huhn, und es war beabsichtigt, monoklonale Antikörper zu entwickeln, welche spezifisch mit verschiedenen Subpopulationen von T-Lymphozyten reagieren.

Die immunofluoreszenzmikroskopische Überprüfung der monoklonalen Antikörper ergab, daß einer der monoklonalen Antikörper alle Blutleukozyten und verschiedene hämatopoetische Zelllinien (B-Lymphoblasten, T-Lymphoblasten, Erythroblasten, Myeloblasten, und Makrophagen), nicht aber reife Erythrozyten markierte. Dieser monoklonale Antikörper könnte bei Studien zur Ontogenese des hämatopoetischen Systems benutzt werden. Deswegen war es erforderlich das Antigen, mit dem dieser monoklonale Antikörper reagiert, biochemisch zu charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Aufarbeitung der Membranen peripherer Blutlymphozyten (Hall, 1985)

Durch Ausbluten von 144 zwei Wochen alter White Leghorn Hühnern wurde circa 1 Liter Blut gewonnen. Zu 15 ml Blut wurden jeweils 15ml Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in Zentrifugenröhrchen gegeben und 40 min lang bei 1200 U/min (400g) zentrifugiert (Böyum, 1968). Die Lymphozytenschicht wurde entnommen, in RPMI 1640 Medium aufgenommen und 10 min bei 1000 U/min (300g) gewaschen. Das Pellet wurde dann in 20ml RPMI 1640 Medium aufgenommen. Das Waschen wurde einmal wiederholt, das Pellet wurde zweimal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung, die 0,1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt (10 μ l 1M PMSF in Dioxan pro 100ml TBS), gespült, und schließlich in 0,1mM PMSF in TBS aufgenommen.

TBS: Tris (Boehringer, Mannheim)	6,1g
NaCl (Merck, Darmstadt)	11,7g
Aqua dest.	ad 1000ml
Mit 5N HCl auf pH 7,4 eingestellt	

Die Lymphozyten wurden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Hierzu wurden die Röhrchen mit Lymphozytensuspension in ein Gemisch aus 140g Eis mit 200g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -21°C eingetaucht. Die gefrorene Suspension wurde in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Dies wurde zweimal wiederholt. Die Suspension wurde in einem Potter-Elvehjem Gerät homogenisiert und 10 min bei 1800 U/min (900g) zentrifugiert um Zellkerne und unlysierte Zellen zu eliminieren. Der Überstand wurde dann in einem Ti50 Rotor für 40 min bei 20 000 U/min (25 000g) zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit 0,1mM PMSF in TBS gespült und in 9ml Lyse-Reagenz aufgenommen.

Lyse-Reagenz:

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)	1g
NaCl (Merck, Darmstadt)	818mg
PMSF (Serva, Heidelberg) in wasserfreien Dioxan (Merck, Darmstadt)	10 μ l
MgCl_2 (Merck, Darmstadt)	20,3mg
NaN_3 (Merck, Darmstadt)	20mg
10mM Tris-HCl (pH 7,8)	100ml
Tris (Boehringer, Mannheim)	121mg
Aqua dest.	ad 100ml
1N HCl	ad pH 7,8

Die Ausbeute der Zellmembranpräparation betrug 11ml. Diese wurden in 150µl Portionen geteilt und in Eppendorfgeräten bei -20°C eingefroren.

2.2. Präparation der Bursa- und Thymus-Zellmembranen

Bursa und Thymus wurden einem 16 Tage alten Leghorn Huhn entnommen. Die Organe wurden in Petrischalen gegeben und auf Eis gehalten. Die Organe wurden mit einem Skalpel zerkleinert und durch ein Stahldrahtnetz (13 Drähte/cm) in eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) durchgedrückt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl (Merck, Darmstadt)	8,8g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O (Merck, Darmstadt)	13,8g
Aqua dest.	ad 1000ml
5N HCl	ad pH 7,2

Die Suspension ließ man 10 min stehen, so daß sich die groben Gewebereste absetzen konnten. Die Einzelzellsuspension wurde dann für 10 min bei 1000 U/min (300g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS aufgenommen und durch Zentrifugieren gewaschen. Ausbeute: 5×10^9 Bursazellen, 3×10^9 Thymuszellen. Jedes Pellet wurde in 5ml 0,1mM PMSF in TBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe der gleichen Gefrier- und Auftau-

methode wie bei der Aufarbeitung von PBL Membranen lysiert. Die Homogenisation und Zentrifugation erfolgte ebenfalls nach der oben beschriebenen Methode. Jedes Pellet wurde zweimal gewaschen und in 1ml Lyse-Reagenz aufgenommen. 250 μ l Portionen wurden in Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren.

2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970)

Lösungen: Acrylamid

Acrylamid, 2x krist. (Serva, Heidelberg)	29,2g
N,N'-Methylenbisacrylamid, 2x krist. (Serva)	0,8g
Glycerin, 87% (Merck, Darmstadt)	60ml
Aqua dest.	ad 100ml

Ammoniumperoxodisulfat (PER) (Merck)	10% in H ₂ O
--------------------------------------	-------------------------

N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)
(Serva, Heidelberg)

Laufpuffer:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	
(Boehringer, Mannheim)	17,14g
Glycin (Serva, Heidelberg)	2,11g
SDS (Serva, Heidelberg)	5g
Aqua dest.	ad 5000ml

Probenpuffer:

Glycerin 87% (Merck, Darmstadt)	25g
SDS (Serva, Heidelberg)	5.8g
Tris (Boehringer, Mannheim)	1,89g
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)	1,0g
Aqua dest.	ad 100ml

Gelpuffer:

Tris (Boehringer, Mannheim)	181,7g
SDS (Serva, Heidelberg)	4g
Aqua dest.	ad 1000ml
5N HCl	ad pH 8,8

Herstellung des Polyacrylamidgels:

Leichte Lösung 3%:

Acrylamidlösung	2ml
Aqua dest.	13ml
Gelpuffer	5ml
PER	65 μ l

Schwere Lösung 15%:

Acrylamidlösung	10ml
Aqua dest.	5ml
Gelpuffer	5ml
PER	65 μ l

Beide Lösungen wurden in je eine Saugflasche pipettiert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe 2 min entgast. Den Lösungen wurden 10 μ l TEMED zugegeben.

Mit je 15ml dieser beiden Lösungen wurde das Gradientenmischgerät gefüllt. Dieses ermöglicht eine lineare Mischung der beiden Lösungen beim Entleeren zwischen zwei Glasplatten (120 x 160 mm), die durch Plexiglasstäbe auf 1,2mm Abstand in einem Gestell gehalten wurden. Die Glasplatten wurden unten durch Agar wasserdicht gemacht. Die Acrylamidkonzentration am untersten Rand lag bei 15% und am obersten bei 3%.

Durch einem "Kamm", der das Gel nach oben hin abschloß, entstanden 13 rechteckige Probestaschen (ca. 5 x 7 mm). Anschließend wurde das Gel zur chemischen Polymerisierung, die durch Ammoniumperoxodisulfat und TEMED erfolgte, etwa 2 Stunden stehen gelassen.

Folgende Molekulargewichtstandards wurden benutzt:

Kinase	142kd
Kinase Untereinheit	136kd
Kinase Untereinheit	42kd
α_2 Makroglobulin (Boehringer, Mannheim)	340kd
α_2 Makroglobulin Untereinheit	170kd
Thyreoglobulin (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	330kd
Ferritin (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	440kd
Ferritin Untereinheit	220kd
Katalase (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	232kd
Katalase Untereinheit	60kd
Laktat Dehydrogenase (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	36kd
Rinder Serum Albumin (Pharmacia, Uppsala, Schweden)	67kd

Die Markerproteine wurden im Probenpuffer gelöst bzw. verdünnt. Die Zellmembranpräparationen wurden im Verhältnis von 1:1 mit Probenpuffer unter Zugabe von 5% 2-Mercaptoäthanol-Lösung (Merck, Darmstadt) verdünnt. Sie wurden dann für 5 min auf 100° erhitzt.

Nach dem Auftragen der Proben und Markersubstanzen wurde bis zum Plattenrand mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Anschließend wurde die Elektrophorese 30 min bei einer Stromstärke von 20 mA (zur Konzentrierung der Proben), danach mit 45 mA durchgeführt. Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hatte, was nach etwa drei Stunden der Fall war.

2.4. Blotting: (Towbin et al., 1979; Kyhse-Andersen, 1985)

Anodenpuffer 1:

Tris (Boehringer, Mannheim)	36,33g
Methanol (Merck, Darmstadt)	200ml
Aqua dest.	ad 1000ml

Anodenpuffer 1:

Tris (Boehringer, Mannheim)	3,03g
Methanol (Merck, Darmstadt)	200ml
Aqua dest.	ad 1000ml

Kathodenpuffer 1:

Tris (Boehringer, Mannheim)	3,03g
ϵ -Aminocapronsäure (Merck, Darmstadt)	5,25g
Methanol (Merck, Darmstadt)	200ml
Aqua dest.	ad 1000ml

Blotting-Papier: Schleicher und Schuell GB 002 (Dassel, BRD)

Nitrocellulose-Membran: Schleicher und Schuell BA 85 ND
(Dassel, BRD)

Das Blotting wurde auf einem Semi-dry Electroblotter (SM 17556; Firma Sartorius, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden die Graphit-Elektroden mit destilliertem Wasser gespült. Auf die anodische (untere) Graphitplatte wurden folgende Schichten aufgelegt, wobei entstehende Lufteinschlüsse jeweils mit der handschuhgeschützten Hand herausgestrichen wurden:

1. 4 Lagen Blotting-Papier, das in Anodenpuffer 1 getränkt war,
2. 2 Lagen Filterpapier, das in Anodenpuffer 2 getränkt war,
3. die in destilliertem Wassergetränkte Nitrocellulose-Membran,
4. das Polyacrylamidgel aus der Elektrophorese. Die Nitrocellulose-Membran wurde markiert, um die einzelnen Proben kennzuzeichnen,
5. 4 Lagen Filterpapier, getränkt mit Kathodenpuffer.

Darauf wurde die kathodische Graphitplatte, die vorher mit destilliertem Wasser gespült war, gelegt. Der Transfer wurde 1 Stunde bei einer Stromstärke von 150 mA durchgeführt. Danach wurde das Gel 1 Stunde lang mit Coomassie Brilliant Blau (Merck, Darmstadt) gefärbt und über Nacht entfärbt.

Färbelösung:

Äthanol 96% (Merck, Darmstadt)	450ml
Eisessig (Merck, Darmstadt)	100ml
Coomassie Brilliantblau R 250 (Merck, Darmstadt)	5g
Aqua dest.	ad 1000ml

Entfärbelösung

Äthanol 96% (Merck, Darmstadt)	781.25ml
Eisessig (Merck, Darmstadt)	312,5ml
Aqua dest.	ad 2500ml

Die Nitrocellulosemembran wurde in 2 Teile geschnitten und so die Molekulargewicht-Standards von den Membranpräparationen getrennt. Die Nitrocellulose mit den Molekulargewicht-Standards wurde 5 min mit Amidoschwarz gefärbt, mit Leitungswasser abgewaschen, 30 min entfärbt, gewaschen und zwischen Blotting-Papier getrocknet.

Färbelösung:

Amidoschwarz (Merck, Darmstadt)	500mg
Methanol (Merck, Darmstadt)	50ml
Eisessig (Merck, Darmstadt)	10ml
Aqua dest.	ad 100ml

Entfärbelösung:

Methanol (Merck, Darmstadt)	450ml
Eisessig (Merck, Darmstadt)	100ml
Aqua dest.	ad 1000ml

2.5. Immunezymatischer Nachweis

Reagenzien:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

PBS-Tween

Tween 20 (Merck, Darmstadt)	500µg
PBS	ad 1000ml

Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS)

Tris (Boehringer, Mannheim)	6,1g
NaCl (Merck, Darmstadt)	11,7g
Aqua dest.	ad 1000ml

Chlornaphthol-Stammlösung

4-Chlor-1-Naphthol (Merck, Darmstadt)	150mg
Methanol (Merck, Darmstadt)	50ml

Substratlösung

Chlornaphthol-Stammlösung	5ml
0,6% H_2O_2	500µl

(30% H_2O_2 mit Wasser 1:50 verdünnt)

TBS	24,5ml
-----	--------

(Endkonzentration: 0,01% H_2O_2 , 3,4mM 4-Chlor-1-Naphthol)

Milchpulver-Lösung

Milchpulver (entfettet)	4g
PBS	ad 100ml

Der Teil der Nitrocellulosemembran mit der geblotteten Zellmembranpräparation wurde in eine Instrumentenschale aus Glas mit Milchpulver-Lösung gegeben und für 30 min in einem Schüttel-Wasserbad bei 37° gehalten. Die Milchpulverlösung sättigt freie Bindungsstellen ab, die sonst den Antikörper binden und eine unspezifische Reaktion ergeben würden. Die Milchpulverlösung wurde abgegossen und die Membran mit 1:10 in PBS-Tween verdünntem Maus-Aszites welcher den monoklonalen Antikörper enthielt, überschichtet. Die überschichtete Membran wurde über Nacht in einer feuchten Kammer (eine Metallschale, die mit einigen Lagen wassergetränktem Filterpapier ausgelegt und mit einer Plastischale abgedeckt war) bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 50ml PBS-Tween 5 min in einem Schüttelbad gewaschen und die Lösung verworfen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt.

Dann wurde die Nitrocellulosemembran mit peroxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörpern von der Ziege (Tago, Burlingame, CA, USA), die 1:50 mit PBS-Tween verdünnt waren, überschichtet und wieder für 1 Stunde in die feuchte Kammer gegeben. Danach wurde sie dreimal jeweils 5 min lang durch Schütteln mit 50ml PBS-Tween gewaschen.

Die Membran wurde in Substratlösung 15 min in einem Schüttelbad inkubiert; danach mit Aqua dest gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet. Nach der Auswertung wurde sie im Dunkeln aufbewahrt.

2.6. Molekulargewichtbestimmung der Polypeptide

Zur Molekulargewichtbestimmung der Polypeptide wurde zu jedem Gel mit Hilfe der Markerproteine eine Eichgerade aufgestellt.

Zur Erstellung der Eichgerade wurden die Wanderungsstrecken der einzelne Banden der Eichproteine ab Gelanfang gemessen. Dann wurde auf halblogarithmischen Papier der Logarithmus der Molekulargewichte der Eichproteine (Ordinate) gegen die gemessenen Wanderungsstrecken (Abzisse) aufgetragen.

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Antigene erfolgte dann dadurch, daß zunächst von den durch Ausmessen der entsprechenden Wanderungsstrecken der Proteine erhaltenen Punkte der Abszisse aus das Lot auf die Eichgerade gefällt wurde. Dabei wurden vorher die durch die unterschiedliche Behandlung der zwei Nitrozellulosemembranteile differierenden Längen korrigiert. Mit Hilfe einer diesen Punkt schneidenden Parallele zur X-Achse konnte dann an der Ordinate das Molekulargewicht des zu definierenden Proteins abgelesen werden.

2.7. Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony (1962)

Puffer:

Barbital-Natrium (Merck, Darmstadt)	29,428g
Natrium Acetat (Merck, Darmstadt)	11,7g
Mit Aqua dest. auf 1,5l auffüllen, dann mit 1N HCl auf pH 8,6 einstellen. Daraufhin auf 3 l auffüllen.	

Agar:

Agarose (Serva, Heidelberg)	7,5g
Puffer	250ml
Aqua dest.	250ml

Das Gemisch wurde bis zum vollständigen Lösen des Agars in einem Wasserbad aufgeheizt. Die Lösung wurde dann auf Objektträgern, die in einem Rahmen eingelegt waren, ausgegossen. Nachdem der Agar erstarrt war, wurden Löcher ausgestanzt. Das Zentralloch wurde mit konzentriertem Zellkulturüberstand gefüllt und die äußeren Löcher mit folgenden -gegen die Immunglobuline der Maus gerichteten- Antiseren:

- Anti-IgG₁
- Anti-IgG_{2a}
- Anti-IgG_{2b}
- Anti-IgM

Die Ratten wurden über Nacht bei Raumtemperatur in eine
temperierte Sauerzucker-Lösung gelegt. Am nächsten Tag wurden
die Permeabilitätsmessungen ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Molekulargewicht des mit CL-1 reagierenden PBL-Antigens

Die Immunreaktion mit CL-1 ergab bei PBL-Membranpräparationen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet wurden, zwei Banden (Abb.1). Durch den Vergleich mit Standard-Proteinen bekannten Molekulargewichts (Abb.2) wurde festgestellt, daß diese Banden Proteinen mit einem Molekulargewicht von 215kd und 200kd entsprechen.

3.2. Molekulargewicht der mit CL-1 reagierenden Antigene aus Thymus- und Bursa-Membran-Präparationen

Die Immunreaktion mit CL-1 bei Thymus- und Bursa-Membran-Präparationen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet wurden, ergab bei Thymus-Membran-Präparationen zwei Banden und bei Bursa-Membran-Präparationen eine Bande (Abb.3). Der Vergleich mit Standard-Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (Abb.4) ergab, daß diese Banden Proteinen mit einem Molekulargewicht von 200kd und 185kd bei den Thymuspräparationen und 215kd bei den Bursapräparationen entsprechen.

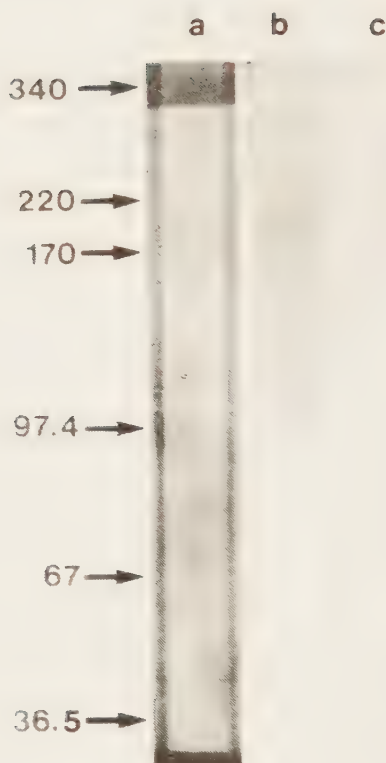


Abb.1: PBL-Membran-Präparation

- a. PBL-Membran-Präparation, die in 3-15% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassieblau R250 gefärbt wurde.
- b. Immunreaktion mit CL-1 auf Nitrozellulosemembran nach Auftrennung in 3-15% SDS-PAGE und Blotting.
- c. Immunreaktion mit einem Kontroll IgG1 Ascites auf Nitrozellulosemembran nach Auftrennung in 3-15% SDS-PAGE und Blotting.

Standardproteine:

- 340kd- α_2 Makroglobulin
- 220kd- Ferritin Untereinheit
- 170kd- α_2 Makroglobulin Untereinheit
- 97,4kd- Phosphorylase b
- 67kd- Bovines Serumalbumin
- 36,5kd- Laktat-Dehydrogenase Untereinheit

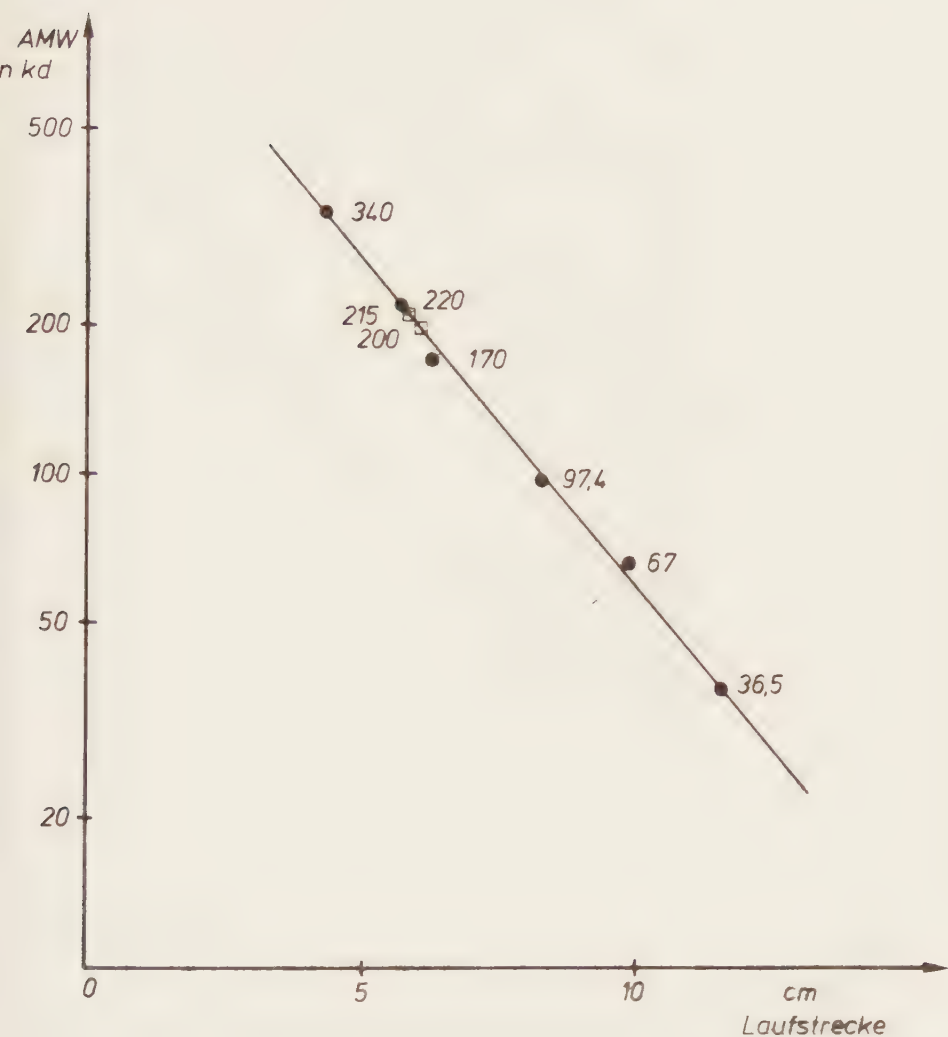


Abb.2: PBL-Membran-Präparation
Molekulargewicht von Antigenen aus PBL-Membranpräparationen, nach SDS-PAGE, Blotting und Immunreaktion mit CL-1. Die Schrumpfung der Nitrozellulose ist berücksichtigt.

□ - Antigen aus PBL

● - Standardproteine:

- 340kd- α_2 Makroglobulin
- 220kd- Ferritin Untereinheit
- 170kd- α_2 Makroglobulin Untereinheit
- 97,4kd- Phosphorylase b
- 67kd- Bovines Serumalbumin
- 36,5kd- Laktat-Dehydrogenase Untereinheit

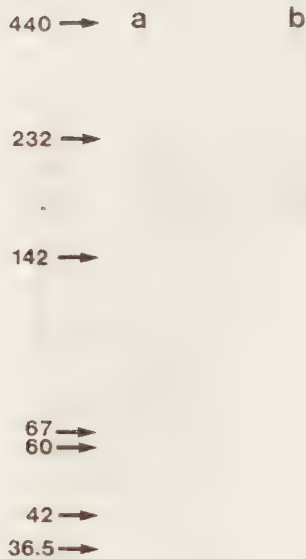


Abb.3: Thymus- und Bursa-Membranpräparationen

- a. Immunreaktion der Bursa-Membran-Präparation mit CL-1 auf Nitrozellulosemembran nach Auftrennung in 3-15% SDS-PAGE und Blotting.
- b. Immunreaktion der Thymus-Membran-Präparation mit CL-1 auf Nitrozellulosemembran nach Auftrennung in 3-15% SDS-PAGE und Blotting.

Standardproteine:

440kd-	Ferritin
232kd-	Katalase
142kd-	Kinase
67kd-	Bovines Serumalbumin
60kd-	Katalase Untereinheit
42kd-	Kinase Untereinheit
36,5kd-	Laktat-Dehydrogenase Untereinheit

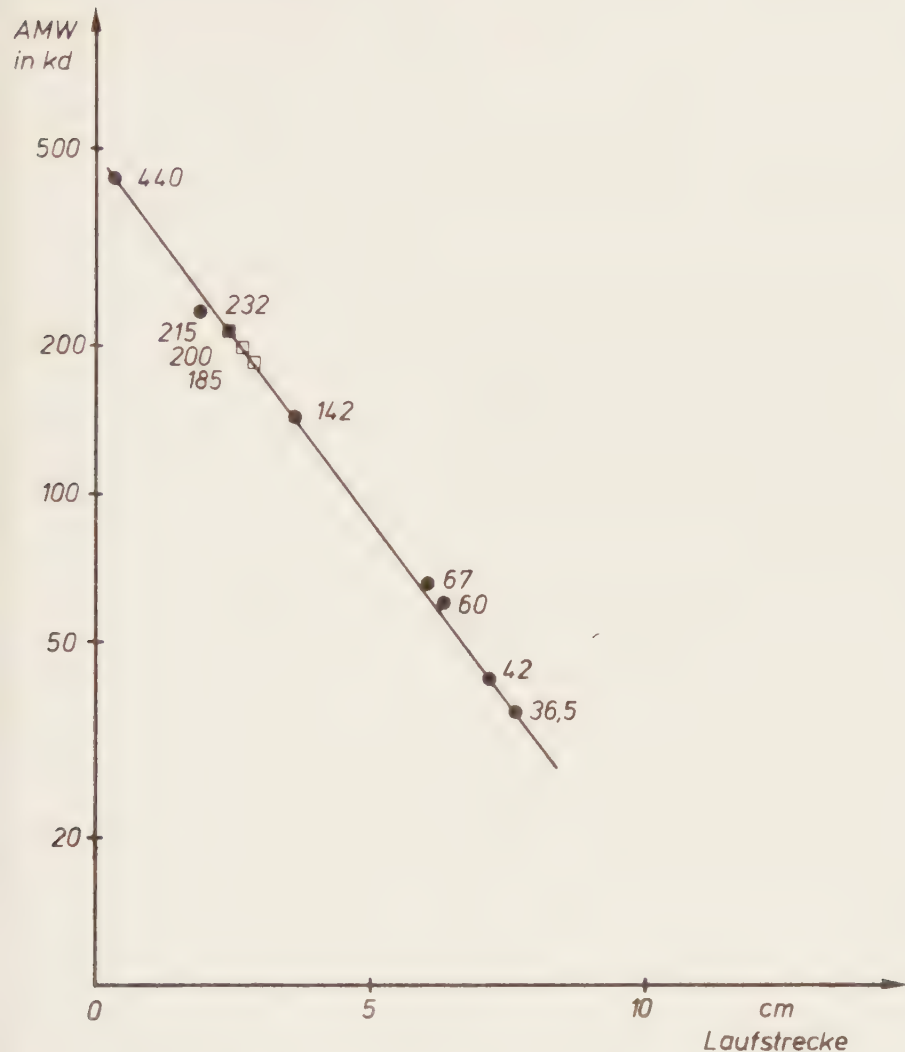


Abb.4: Thymus- und Bursa-Membran-Präparationen
Molekulargewicht von Antigenen aus Thymus- und
Bursapräparationen nach SDS-PAGE, Blotting und Immunreaktion
mit CL-1. Die Schrumpfung der Nitrozellulose ist
berücksichtigt.

■ -Antigen aus der Bursapräparation

□ -Antigen aus der Thymuspräparation

● -Standardproteine: 440kd- Ferritin

232kd- Katalase

142kd- Kinase

67kd- Bovines Serumalbumin

60kd- Katalase Untereinheit

42kd- Kinase Untereinheit

36,5kd- Laktat-Dehydrogenase Untereinheit

3.3. Doppelte Immundiffusion nach Ouchterlony

Bei der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony ergab sich eine Präzipitationslinie zwischen dem zentralen, mit Aszites beschichteten Loch und der mit Anti-IgG₁-Antiserum beschichteten Loch (Abb.5). Eine weitere Reaktion war nicht nachweisbar. Demnach handelt es sich bei CL-1 um ein IgG₁-Immunglobulin.

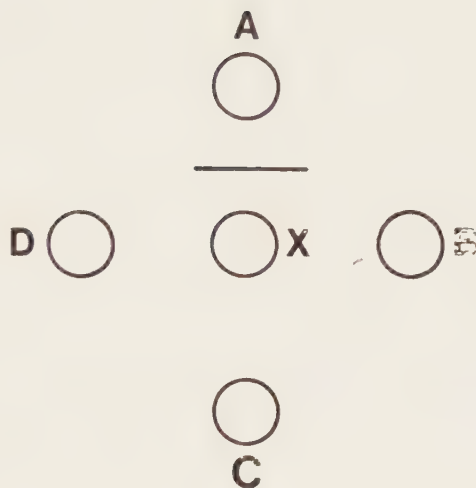


Abb.5: Ergebnisse der doppelten Immundiffusion nach Ouchterlony

Eine Präzipitationslinie war zwischen den Löchern A und X zu sehen.

Die Löcher wurden wie folgt gefüllt

A: Anti-IgG₁ Antiserum

B: Anti-IgG_{2a} Antiserum

C: Anti-IgG_{2b} Antiserum

D: Anti-IgM Antiserum

X: CL-1-haltiges Aszites von der Maus

4. DISCUSSION

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des mit dem monoklonalen Antikörper CL-1 reagierenden Antigens aus PBL-Membranpräparationen wurde eine SDS-PAGE mit darauffolgendem Immunoblotting durchgeführt. Dabei markierte der Antikörper Banden mit 215kd und 200kd Molekulargewicht. Bei den Bursamembranpräparationen, die auf die gleiche Weise untersucht wurden, ergab sich ein Molekulargewicht von 215kd, während die gleiche Analyse einer Thymuszellmembranpräparation zwei Banden mit 200kd und 185kd zeigte. Es ist wahrscheinlich, daß das PBL-Antigen mit dem Molekulargewicht von 215kd von B-Lymphozyten stammt und das PBL-Antigen mit Molekulargewicht 200kd von T-Lymphozyten.

Houssaint et al.(zur Publikation eingesandt) fanden, daß der monoklonale Antikörper CL-1 im indirekten Immunfluoreszenztest alle Thymus- und Bursalymphozyten sowie alle Leukozyten einschließlich der Granulozyten aus der Milz, aus dem Blut und aus Knochenmark markierte und auch alle transformierten hämatopoetischen Zellen: Makrophagen, Myeloblasten, B-Lymphoblasten und AEV-transformierte Erythroblasten; also alle hämatopoetischen Zellen außer reifen Erythrozyten, nicht

jedoch andere Zelltypen. CL-1 scheint ein art-spezifischer Antikörper zu sein. Er reagiert nicht mit hämatopoetischen Zellen von Wachteln. CL-1 markierte extraembryonale Dottersackzellsuspensionen von 3 Tage alten Hühnerembryonen, was die Ergebnisse von LeDouarin und Jotereau (1975) bezüglich der extraembryonalen Herkunft der hämatopoetischen Zellen bestätigt.

Kornfeld et al.(1983) beschrieben einen monoklonalen Antikörper, 50-3-C, welcher mit allen hämatopoetischen Zellen von Hühnern außer Erythrozyten reagierte. Dieser Antikörper präzipitierte jedoch keinerlei Proteine. Ein anderer Antikörper, L.17, von Pink und Rijnbeek (1983) beschrieben, reagierte mit allen Hühnerleukozyten. Die biochemische Analyse des Antigens zeigte, daß es zum "Leukocyte-Common Antigen" gehört. Allerdings reagieren CL-1 und L.17 wahrscheinlich mit verschiedenen antigenen Determinanten. Das durch L.17 determinierte Antigen wird durch Paraformaldehydfixation und Einbetten in PEG zerstört und reagiert nur an Kryostatschnitten. Houssaint et al., (zur Publikation eingeschickt) hingegen benutzten CL-1 bei Immunfluoreszenzuntersuchung an PEG-Gewebeschnitten nach Paraformaldehydfixation.

Auch das mit L.17 reagierende Antigen (Pink und Rijnbeek, 1983) zeigte Unterschiede im Molekulargewicht zwischen Thymus- und Bursazellen, nämlich 180 bzw. 210kd. Während diese Molekulargewichte etwas von unseren Ergebnissen abweichen, was an methodischen Unterschieden oder an unvermeidbaren Ungenauigkeiten bei der Molekulargewichtsbestimmung in dieser Größenordnung liegen kann, ist die Bursa-Thymus-Beziehung mit dem Bursa-Antigen etwas über 200kd und dem Thymus-Antigen etwas unter 200kd in guter Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen.

Peault et al. (1983) produzierten einen monoklonalen Antikörper MB1, welcher mit allen hämatopoetischen Zellen der Wachtel reagierte, sowohl mit frühen Formen aus intra- und extraembryonalen hämatopoetischen Bildungszentren als auch mit Zellen aus späten Stadien der Differenzierung von Endothel- und Blutzellen. Einzige Ausnahme bilden die Erythrozyten, während deren Reifung das Antigen verschwindet. Bei der biochemischen Analyse zeigte sich jedoch, daß MB1 mit Antigenen von 80 und 180kd Molekulargewicht reagierte.

Das CL-1-Antigen ist ein Antigentyp, der nicht nur beim Huhn vorkommt. Dieser Antigentyp mit einem Molekulargewicht von ungefähr 200kd, bei B-Zellen etwas höher, bei T-Zellen etwas niedriger, kommt auf allen hämatopoetischen Zellen außer reifen Erythrozyten vor und wurde auch bei anderen Spezies gefunden. Bei der Maus wurde das Antigen als T200 (Trowbridge et al., 1977) oder Leukocyte Common Antigen (LCA) bezeichnet. Unter dieser Bezeichnung ist es auch bei der Ratte (Standring et al., 1978), Mensch (Dalchau et al., 1980) und dem Schwein (Pescowitz et al., 1984) bekannt.

Aus funktionellen Studien, bei denen monoklonale Antikörper benutzt wurden, ist die Beteiligung des LCA an einer Reihe immunologischer Reaktionen ersichtlich. Kasai et al. (1979) zeigten, daß Zellen, die Natural-Killer(NK)-Aktivität ausüben, Stoffe produzieren, welche durch den Ly-5-Lokus determiniert sind, und daß Ly-5 direkt zur NK-vermittelten Zytolyse beitragen kann, da die NK-Aktivität durch Ly-5-Antiserum gehemmt wird. Nach Scheid und Triglia (1979) ist Ly-5 an allen hämatopoetischen Zellen außer an Erythrozyten vorhanden, nicht aber an anderen Zellen. T-Zellen aus der Milz weisen Ly-5-Aktivität auf, die an Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 175-185kd gebunden ist, während B-

Zellen aus der Milz Ly-5-Aktivität aufweisen, die durch Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 220kd bedingt ist (Michaelson et al.,1979). Es wurde postuliert, daß diese Variabilität in der Größe des Ly-5-Moleküls eine Folge von Unterschieden in den Kohlenhydratgruppen, die an ein einzelnes Protein gebunden sind, darstellt.

Yakura et al. (1983) zeigten, daß Antikörper gegen Ly-5 B-Zellen beeinflussen. Sie zogen den Schluß, daß das Ly-5 System wahrscheinlich an der Aufnahme oder Verarbeitung der Makrophageninformation durch B-Zellen und damit an der B-Zelldifferenzierung beteiligt ist.

Das Ly-5 Molekül spielt bei Proliferations- und Differenzierungs-Vorgängen von T-Zellen eine Rolle, ebenso wie es bei zytolytischen Effektorprozessen von T- und anderen Zellen mitwirkt, wie es früher von Nakayama et al.(1979) angenommen wurde (Harp et al.,1984). Antikörper gegen das Analog des T200 Moleküls im Menschen blockieren die Natural- Killer-Aktivität (Sparrow und McKenzie, 1983) in einer Phase zwischen der Bindung und dem Abtöten der Zelle. Monoklonale Antikörper gegen Ly-5 blockieren die Entstehung von plaque-bildenden Zellen gegen Schaferythrozyten indem sie frühzeitig

auf die Aktivierung von B-Zellen einwirken; möglicherweise durch Verhinderung der Aufnahme des Makrophagen-Helfer-Faktors.

Ledbetter et al.(1985) zeigten, daß monoklonale Antikörper mit der höhermolekularen Form des T200-Antigenanalogs im Menschen, genannt p220, mit B-Zellen, NK-Zellen, 50% der $CD4^{+}$ T-Helferzellen und 90% der $CD8^{+}$ -Suppressorzellen reagieren.

Ihre Daten deuten darauf hin, daß p220 funktionell mit der Ausbildung des IL-2 Rezeptors verbunden ist und daß Zellen, die die meisten IL-2 Rezeptoren haben, im geringsten Maß p220 besitzen. Weiterhin nehmen sie an, daß der Verlust von p220 auf T-Zellen durch die Differenzierung und Zellaktivierung nach der Thymus-Passage verursacht ist, so daß p220- T-Zellen im peripheren Blut möglicherweise eine höher aktivierte Gruppe von T-Zellen darstellen.

Spicket et al. (1983) konnten funktionelle Subpopulationen der T-Helferzellen in der Ratte mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die mit der höhermolekularen Form des LCA reagierten, unterscheiden.

Es wurden auch schon bedeutende Anstrengungen hinsichtlich der Aufklärung der LCA-Struktur unternommen. Bei LCA verschiedener Zelltypen wurden Unterschiede im Molekulargewicht festgestellt. Diese zellspezifischen Merkmale finden sich bei allen untersuchten Säugetierarten und, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch bei Vögeln (Standring et al.,1978; Trowbridge,1978; Michaelson et al.,1979; Omary et al.,1980). Woollett et al.(1985) fanden bei SDS-PAGE von Ratten-LCA eine einzelne Bande von Thymozyten (180kd), 4 Banden von peripheren T-Zellen (180kd,190kd,200kd,220kd) und eine breite Bande von B-Zellen (240kd).

Es zeigte sich, daß LCA eines der Hauptoberflächenmoleküle aller lymphoider Zellen darstellt, welches viel von den Kohlenhydraten dieser Zellen trägt (Brown et al.,1981; Brown und Williams,1982). Diese Kohlenhydratstrukturen, die O-glykosidisch verknüpften Oligosaccharide zusätzlich zu den gewöhnlicheren N-glykosidisch verknüpften Verbindungen enthalten, unterscheiden sich entsprechend des Zelltyps (Brown und Williams,1982; Childs et al.,1983; Raschke und Hyman,1985). Die Thymozytenreifung zu T-Zellen geht mit einer Bindung von Sialinsäure an die O-glykosidisch verknüpften Oligosaccharide einher (Brown und Williams,1982).

Lefrancois et al. (1985) zeigten, daß diese Kohlenhydrate für die Ausbildung eines Aktivierungsantigens an zytotoxischen T-Lymphozyten notwendig sind. Tung et al. (1984) wiesen darauf hin, daß die Unterschiede im Molekulargewicht wahrscheinlich nicht nur auf den Kohlenhydratanteilen, sondern auch auf Unterschieden in der Proteinstruktur beruhen. Lefrancois und Kanagawa (1986) fanden Unterschiede im Protein induzierter und nicht induzierter zytotoxischer Lymphozyten. Thomas et al. (1985) konnten durch Analyse von B- und T-Lymphozyten-cDNA-Klonen Unterschiede in den 5' Sequenzen, die zu Unterschieden in den Polypeptidketten führen, nachweisen.

LCA-Glykoproteine sind in ihren Antigendeterminanten sehr unterschiedlich. Einige monoklonale Antikörper erkennen bei allen LCA-Formen vorkommende Determinanten, während andere auf LCA verschiedener Zelltypen beschränkt sind (Coffman und Weissman, 1981; Dalchau und Fabre, 1981; Woollett et al., 1985). Die gemeinsam vorkommenden Determinanten wurden als Marker zur Leukozytenidentifizierung in verschiedenen Geweben und zur Unterscheidung zwischen Lymphomen und Tumoren anderer Zellgenese benutzt (Gatter et al., 1982). Determinanten, die nur begrenzt vorkommen, ermöglichten die Identifizierung zweier funktionell unterschiedlicher Arten von T-Helfer-

zellen (Spickett et al.,1983). Man findet innerhalb einer Spezies eine Vielgestaltigkeit von LCA-Antigenen, wie z.B. die ART-1 oder Ly-1 Allotypen bei der Ratte (Lubaroff,1973; Fabre und Morris,1974; Carter und Sunderland,1980) und die Ly-5 Allotypen bei der Maus (Scheid und Triglia,1979; Omary et al.,1980).

Ein großer Anteil des LCA, in der Maus T200, befindet sich anscheinend innerhalb der Zelle (Hyman et al.,1982), und dieser Teil der Struktur ist phosphoryliert (Omary und Trowbridge,1980; Thomas et al.,1985). Es gibt auch Hinweise, daß LCA mit anderen Molekülen in der Zellmembran in Verbindung steht, da gleichzeitig mit LCA eine Anzahl anderer Antigene durch anti-LCA-Antikörper beeinflusst wird (Bourguignon et al.,1978; Nakayama et al.,1979; Burns et al.,1984).

Alle diese Faktoren zusammengenommen ergeben hinsichtlich des LCA das Bild eines phylogenetisch alten, sorgsam bewahrten Glykoproteins, welches man möglicherweise auch in den hämatopoetischen Zellen niedriger Wirbeltiere finden könnte. Die Grundstruktur scheint sich während der evolutionären Entwicklung erhalten zu haben, wobei funktionelle Änderungen meist durch Veränderungen der Kohlenhydrate bedingt sind (Brown und Williams,1982; Raschke und Hyman,1985). Das Molekül hat in verschiedenen hämatopoetischen Zellen unterschiedliche Funktionen übernommen (Lefrancois und Bevan,1985; Lefrancois und Kanagawa,1985; Lefrancois et al.,1986). Lymphozytenreifung ist wahrscheinlich von der Bindung von Sialinsäure an die Glykoside abhängig. Dabei wird die Spezifität und Reaktivität vielleicht durch die Freilegung spezifischer Glykoside bestimmt (Brown und Williams,1982).

Die auf SDS-PAGE basierende Molekulargewichtsbestimmung liefert ein angenähertes Molekulargewicht, genannt "Apparent Molecular Weight" (AMW). Das Prinzip beruht darin, daß die Dodecylsulfat-Ionen eine negativ geladene Hülle um die Proteinmoleküle bilden, die dann eine Wanderung zur Anode im elektrischen Feld ermöglicht. In einem homogenen Polyacrylamidgel wird die relative Wanderungsgeschwindigkeit durch die

Molekül- und Porengröße bestimmt. Moleküle, die größer als die Poren sind, können nicht in das Gel eindringen, und sehr kleine Moleküle werden in ihrer Bewegung überhaupt nicht behindert. Innerhalb dieser zwei Extreme ist die Geschwindigkeit vom Reibungswiderstand abhängig; größere Moleküle sehen sich einem größeren Widerstand gegenüber und wandern dadurch langsamer.

Eine Ungenauigkeit muß durch die Tatsache in Betracht gezogen werden, daß das Protein durch die Poren treten muß. Dabei ist die Passage nicht nur von der Gesamtgröße, sondern auch von der Form der Moleküle abhängig. Lange, schmale Moleküle können selbstverständlich durch kleinere Poren wandern als runde Moleküle. Deswegen kann man das Molekulargewicht nur annähernd und nicht genau bestimmen, indem die Bewegung von Molekülen mit bekanntem Molekulargewicht zum Vergleich herangezogen wird.

In einem Gradientengel wandern alle Moleküle soweit bis die Poren kleiner als die Moleküle sind. Dieses Gel ist für eine Proteintrennung bei einer großen Bandbreite der Molekulargewichte offensichtlich besser geeignet. Dieses Verfahren

ergibt auch bei einem engen Spektrum der Molekulargewichte eine bessere Auftrennung, wenn das passende Gradientengel gewählt wurde. Die Molekültrennung im 200kd-Bereich erfordert ein 3-5% Polyacrylamidgel. Das Gel ist in der niederen Acrylamidkonzentration so weich, daß es sich dehnt und verformt, was zu weiteren Ungenauigkeiten führen kann. Eine Kunststoffolienunterlage erlaubt keine Durchwanderung von Wasser oder Ionen; somit kann ein Elektrophoretikum nach der Elektrophorese nicht durchgeführt werden. Zur leichteren Handhabung des Gels machten wir einen Versuch mit einer Zellophanunterlage. Allerdings konnte eine Verformung des Gels nicht vollständig vermieden werden. Ausserdem löste sich das Gel bei der weiteren Behandlung (Blotting, Färbung, Entfärbung) vom Zellophan; deshalb wäre es von Interesse, zu untersuchen, ob sich die Verformung bei Verwendung von Zellophan auf beiden Seiten des Gels ganz ausschließen ließe. Durch beidseitiges Bedecken mit Zellophan ließe sich eventuell die mechanische Bewegung ausreichend reduzieren, so daß eine Lösung des Gels vom Zellophan verhindert werden könnte.

Zu beobachten war, daß der Trennungsvorgang mit einem Puffer, der mit Glycin der Firma Merck hergestellt wurde, doppelt solange wie bei Verwendung des Glycins der Firma Serva dauerte. Obwohl beide die Bezeichnung "Analytical Grade" hatten, ergab der mit dem Glycin von Merck hergestellte Puffer einen höheren pH. Die Angabe für die Reinheit des Glycins lautet bei Merck auf 99,7%, demgegenüber bei Serva auf 99,9%. Der Ionengehalt bestimmt das elektrokinetische Potential, welches die Nettoladung auf die Effektivladung reduziert, und es ergibt sich, daß die Beweglichkeit der geladenen Teile annähernd umgekehrt proportional zur Quadratwurzel des Ionengehaltes ist. Geringerer Ionengehalt erlaubt eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit, während hohe Ionenkonzentration eine niedrigere Geschwindigkeit ergibt (Andrews, 1986).

Ursprünglich versuchten wir die Membranproteine ohne Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol zu trennen. Obwohl bei den reduzierten und nicht reduzierten Proben Banden in demselben Bereichen gefunden wurden, ergaben die unreduzierten Proben diffuse Banden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Antigenspezifität eines monoklonalen Antikörpers gegen Hühnerleukozyten (CL-1) wurde untersucht. Die biochemische Charakterisierung des korrespondierenden Antigens mittels PAGE und Immunoblotting führte zu folgende Ergebnis: Das mit dem betreffenden Antikörper reagierende Antigen besteht aus zwei Komponenten mit den Molekulargewichten von 200kd und 215kd, wenn periphere Blutlymphozyten getestet wurden. In Bursa- und Thymus-Präparationen reagiert dieser Antikörper mit Antigenen von etwas unterschiedlichem Molekulargewicht; 215kd in der Bursa und 200kd und 185kd im Thymus.

Auf Grund dieser biochemischen Charakterisierung und der Reaktivität des monoklonalen Antikörpers mit Organpräparationen und Hühnerzelllinien wurde geschlossen, daß das Antigen dem Leukocyte Common Antigen (LCA) entspricht.

6. SUMMARY

Characterization of a Chicken Leukocyte Antigen

The antigen specificity of a monoclonal antibody (CL-1) against chicken leukocytes was investigated. The biochemical characterization of the corresponding antigen by means of PAGE and immunoblotting gave the following results: The antigen which reacted with the antibody consisted of 2 components, with a molecular weight of 200kd and 215kd, when peripheral blood lymphocytes were tested. This antibody reacted with antigens in bursa and thymus preparations having somewhat different molecular weights: 215kd in the bursa and 200kd and 185kd in the thymus.

Based on this biochemical characterization and the reactivity of the monoclonal antibody with organ preparations and chicken cell lines, it was determined that this antigen corresponds to the Leukocyte Common Antigen (LCA).

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDREWS, A.T., 1986

Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and
Clinical Applications

Clarendon Press, Oxford

BÖYUM, A., 1968

Isolation of mononuclear cells and granulocytes from
human blood.

Scand. J. Clin. Invest., Suppl. 21, 77-89

BOURGUINON, L.Y.W., R. HYMAN, I.S. TROWBRIDGE,
UND S.J. SINGER, 1978

Participation of histocompatibility antigens in capping
of molecularly independent cell surface components by
their specific antibodies.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 2406-2410

BOYD, R.L. und H.A. WARD, 1978

Lymphoid antigenic determinants of the chicken cellular
representation and tissue localization.

Immunology, 34, 9-17

BROWN, W.R.A., A.N. BARCLAY, C.A. SUNDERLAND

und A.F. WILLIAMS, 1981

Identification of a glycophorin-like molecule at the surface of rat thymocytes.

Nature, 289, 456-460

BROWN, W.R.A. und A.F. WILLIAMS, 1982

Lymphocyte cell surface glycoproteins which bind to soybean and peanut lectins.

Immunology, 46, 713-726

BURNS, G.F., J.A. WERKMEISTER und T. TRIGLIA, 1984

A novel antigenic cell surface protein associated with T200 is involved in the post-activation stage of human NK cell mediated lysis.

J. Immunol., 133, 1391-1396

CARTER, P.B. und SUNDERLAND, C.A., 1980

Biochemical identification of rat ART-1 and Ly-1 alloantigens.

Immunogenetics, 10, 583-593

CHEN, C.H., T.C. CHANH und M.D. COOPER, 1984

Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization.

Eur. J. Immunol., 14, 385-391

CHILDS, R.A., R. DALCHAU, P. SCUDDER, E.F. HOUNSELL, J.W. FABRE und T. FEIZI, 1983

Evidence for the occurrence of O-glycosidically linked oligosaccharides of poly-n-acetyl lactosamine on the human leukocyte common antigen.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 110, 424-431

COFFMAN, R.L. und I.L. WEISSMAN, 1981

B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family.

Nature, 289, 681-683

DALCHAU, R. und J.W. FABRE, 1981

Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen.

J. Exp. Med., 153, 753-765

DALCHAU, R., J. KIRKLEY und J.W. FABRE, 1980

Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte common (L-C) antigen of the rat.

Eur. J. Immunol., 10, 737-744

FABRE, J.W. und P.J. MORRIS, 1974

The definition of a lymphocyte-specific alloantigen system in the rat (Ly-1).

Tissue Antigens, 4, 238-246

FORGET, A., E.F. POTWOROWSKI, G. RICHER, und A.G. BORDUAS, 1970

Antigenic specificities of bursal and thymic lymphocytes in the chicken.

Immunology, 19, 465-468

FREDERICKSEN, T.L. und D.G. GILMOUR, 1981

Two independent T-lymphocyte antigen loci in the chicken, Ly-4 and Th-1.

Immunogenetics, 14, 535-539

GALFRE, G., S.C. HOWE, C. MILSTEIN, G.W. BUTCHER

und J.C. HOWARD, 1977

Antibodies to major histocompatibility antigens produced
by hybrid cell lines.

Nature, 266, 5500-552

GATTER, K.C., Z. ABDULAZIZ, P. BEVERLY, J.R.F. CORVALAN, C. FORD,

E.B. LANE, M. MOTA, J.R.G. NASH, K. PULFORD, H. STEIN,

J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, C. WOODHOUSE, und D.Y. MASON, 1982

Use of monoclonal antibodies for the histopathological
diagnosis of human malignancy.

J. Clin. Pathol., 35, 1253-1267

GILMOUR, D.G., A. BRAND, N. DONNELLY, und H.A. STONE, 1976

Bu-1 and Th-1, two loci determining surface antigens of
B or T lymphocytes in the chicken.

Immunogenetics, 3, 549-563

GREBENAU, M.D., S.P. LERMAN, M.A. PALLADINO und G.J. THORBECKEL, 1976

Suppression of adoptive antibody responses by addition
of spleen cells from agammaglobulinemic chickens
"immunised" with histocompatible bursa cells.

Nature, 260, 46-48

HALL, R.E., 1985

A monoclonal antibody (RH1-38) which inhibits multiple systems of cell-mediated cytotoxicity. I. Identification of a novel epitope on a killer cell surface bimolecular complex important in the cytotoxic response.

Molecular Immunology, 22, 757-764

HARP, J.A., B.S. DAVIS, und S.J. EWALD, 1984

Inhibition of T cell responses to alloantigens and polyclonal mitogens by Ly-5 antisera.

J. Immunol., 133, 10-15

HOUSSAINT, E., E. DIEZ, und F.V. JOTEREAU, 1985

Tissue distribution and ontogenic appearance of a chicken T lymphocyte differentiation marker.

Eur. J. Immunol., 15, 3305-308

HOUSSAINT, E., S. TOBIN, J. CIHAK, und U. LÖSCH, 1986

A chicken leukocyte common antigen: biochemical characterization and ontogenetic study.

In Vorbereitung

HUDSON, L., und I.M. ROITT, 1973

Immunofluorescent detection of surface antigens specific to T and B lymphocytes in the chicken.

Eur. J. Immunol., 3, 63-67

HYMAN, R., I.S. TROWBRIDGE, V. STALLINGS, und J. TROTTER, 1982

Revertant expressing a structural variant of T200 glycoprotein.

Immunogenetics, 15, 413-420

ISAKOVIC, K., K. MITROVIC, B.M. MARKOVIC, M. RAJCEVIC, und

B.D. JONKOVIC, 1975

Preparation of specific anti-thymocyte and anti-bursocyte sera in rabbits.

J. Immunol. Methods, 7, 359-369

IVANYI, J., und P.M. LYDYARD, 1972

Delineation of chicken lymphocyte populations by specific anti-thymus and anti-bursa sera.

Cell. Immunol., 5, 180-189

JOTEREAU, F.V., E. HOUSSAINT, und N.M. LEDOUARIN, 1980

Lymphoid stem cell homing to the early thymic primordium
of the avian embryo.

Eur. J. Immunol., 10, 620-627

KASAI, M., J.C. LECLERC, F.W. SHEN, und H. CANTOR, 1979

Identification of Ly-5 on the surface of "Natural Killer"
cells in normal and athymic inbred mouse strains.

Immunogenetics, 8, 153-159

KÖHLER, G., und C. MILSTEIN, 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody
of predefined specificity.

Nature, 256, 495-497

KORNFELD, S., H. BEUG, G. DODERLEIN, und T. GRAF, 1983

Detection of avian hematopoietic cell surface antigens
with monoclonal antibodies to myeloid cells.

Exp. Cell. Res., 143, 383-394

KYHSE-ANDERSEN, J., 1985

Electroblotting of multiple gels- A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biophys. Biochem. Methods, 10, 203-209

LAEMMLI, U.K., 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227, 680-685

LEDBETTER, J.A., L.M. ROSE, C.E. SPOONER, P.G. BEATTY, P.J. MARTIN, und E.A. CLARK, 1985

Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL 2 receptor expression.

J. Immunol., 135, 1819-1825

LEDOUARIN, N.M., und F.V. JOTEREAU, 1975

Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras.

J. Exp. Med., 142, 17-40

LEFRANCOIS, L. und M.J. BEVAN, 1985

Novel antigenic determinants of the T200 glycoprotein
expressed preferentially by activated cytotoxic
T lymphocytes.

J. Immunol., 135, 374-383

LEFRANCOIS, L., und M.J. BEVAN, 1985

Functional modifications of cytotoxic T-lymphocyte T200
glycoprotein recognized by monoclonal antibodies.

Nature, 314, 449-452

LEFRANCOIS, L., und O. KANAGAWA, 1986

Coordinate expression of cytolytic activity and cytotoxic
T cell-specific carbohydrate antigens in a T cell hybridoma.

J. Immunol., 136, 1171-1177

LEFRANCOIS, L., L. PUDDINGTON, C.F. MACHAMER, und M.J. BEVAN, 1985

Acquisition of cytotoxic T lymphocyte-specific carbohydrate
differentiation antigens.

J. Exp. Med., 162, 1275-1293

LEFRANCOIS, L., M.L. THOMAS, M.J. BEVAN, and I.S. TROWBRIDGE, 1986

Different classes of T lymphocytes have different mRNA's
for the leukocyte common antigen, T200.

J. Exp. Med., 163, 1337-1342

LITTLEFIELD, D.W., 1964

Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro
and their presumed recombinants.

Science, 145, 709-710

LUBAROFF, D.M., 1973

An alloantigenic marker on rat thymus and thymus-derived
cells.

Transplant. Proc., 5, 115-118

MALCHOW, D., W. DROEGE, and J.L. STROMINGER, 1972

Solubilization and partial purification of lymphocyte
specific antigens in chickens.

Eur. J. Immunol., 2, 30-35

MCARTHUR, W.P., J. CHAPMAN, and G.J. THORBECKE, 1971

Immunocompetent cells of the chicken. I. Specific
surface antigenic markers on bursa and thymus cells.

J. Exp. Med., 134, 1036-1045

MICHAELSON, J., M. SCHEID, und E.A. BOYSE, 1979

Biochemical features of Ly-5 alloantigen.

Immunogenetics, 9, 193-197

NAKAYAMA, E., H.SHIKU, E.STOCKERT, H.F.OETTGEN und L.J.OLD, 1979

Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 1977-1981

OMARY, M.B., und I.S. TROWBRIDGE, 1980

Disposition of T200 glycoprotein in the plasma membrane of a murine lymphoma cell line.

J. Biol. Chem., 255, 1662-1669

OMARY, M.B., I.S. TROWBRIDGE, und H.A. BATTIFORA, 1980

Human homologue of murine T200 glycoprotein.

J. Exp. Med., 152, 842-852

OMARY, M.B., I.S. TROWBRIDGE und M.P. SCHEID, 1980

T200 cell surface glycoprotein of the mouse polymorphism defined by the Ly-5 system of alloantigens.

J. Exp. Med., 151, 1311-1316

OUCHTERLONY, Ö., 1962

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

In: II. Prog. in Allergy, 6, 30-154. Karger, Basel

PEAULT, B.M., M. COLTEY, und N.M. LEDOUARIN, 1982

Tissue distribution and ontogenetic emergence of
differentiation antigens on avian T cells.

Eur. J. Immunol., 12, 1047-1050

PEAULT, B.M., J.P. THIERY, und N.M. LEDOUARIN, 1983

Surface marker for hemopoietic and endothelial cell
lineages in quail that is defined by a monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 2976-2980

PESCOVITZ, M.D., J.K. LUNNEY, und D.H. SACHS, 1984

Preparation and characterization of monoclonal antibodies
reactive with porcine PBL.

J. Immunol., 133, 368-375

PINK, J.R., B. FEDEKA-BRUNER, M. COLTEY, B.M. PEAULT, und
N.M. LEDOUARIN, 1981

Biochemical characterization of avian T-lymphocyte
specific antigens.

Eur. J. Immunol., 11, 517-520

PINK, J.R. und A.M. RIJNBEEK, 1983

Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens.

Hybridoma, 2, 287-296

RASCHKE, W.C. und R. HYMAN, 1985

Stable expression of the mouse lymphocyte T200 antigen in L-cells after transfection with lymphoma DNA.

Molecular Immunology, 22, 1137-1143

SCHEID, M.P. und D. TRIGLIA, 1979

Further description of the Ly-5 system.

Immunogenetics, 9, 423-433

SPARROW, R.I. und I.F.C. MCKENZIE, 1983

A function for human T200 in natural killer cytotoxicity.

Transplantation, 36, 166-171

SPICKETT, G.P., M.R. BRANDON. D.W. MASON, A.F. WILLIAMS und G.R. WOOLLETT, 1983

MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen.

J. Exp. Med., 158, 795-810

STANDRING, R., W.R. MCMASTER, C.A. SUNDERLAND und
A.F. WILLIAMS, 1978

The predominant heavily glycosylated glycoproteins at the
surface of rat lymphoid cells are differentiation antigens.
Eur. J. Immunol., 8, 832-839

SUGIMOTO, M., T. YASUDA und Y. EGASHIRA, 1977

Development of the embryonic chicken thymus.

I. Characteristic synchronous morphogenesis of lymphocytes
accompanied by the appearance of an embryonic thymus-
specific antigen.

Dev. Biol., 56, 281-292

THOMAS, M.L., A.N. BARCLAY, J. GAGNON und A.F. WILLIAMS, 1985

Evidence from cDNA clones that the rat leukocyte-common
antigen (T200) spans the lipid bilayer and contains a
cytoplasmic domain of 80,000Mr.

Cell, 41, 83-93

TOWBIN, H., T. STAEGELIN und J. GORDON, 1979

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel
to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350-4354

TRAILL, K.N., G. BÖCK, R.L. BOYD, K. RATHEISER und G. WICK, 1984

Ontogeny of surface markers on functionally distinct
T cell subsets in the chicken.

Eur. J. Immunol., 14, 61-67

TROWBRIDGE, I.S., 1978

Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal
antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein,
T200.

J. Exp. Med., 148, 313-323

TROWBRIDGE, I.S., M. NILSEN-HAMILTON, R.T. HAMILTON und

M.J. BEVAN, 1977

Preliminary characterization of two thymus-dependent
xenoantigens from mouse lymphocytes.

Biochem. J., 163, 211-217

TUNG, J.S., M.C. DEERE und E.A. BOYSE, 1984

Evidence that Lyt-5 product of T and B cells differ in
protein structure.

Immunogenetics, 19, 149-154

WICK, G., B. ALBINI und F. MILGROM, 1973

Antigenic surface determinants of chicken lymphoid cells.
I. Serologic properties of anti-bursa and anti-thymus sera.
Clin. Exp. Immunol., 15, 2337-249

WOOLLETT, G., A.N. BARCLAY, M. PUKLAVEC und A.F. WILLIAMS, 1985

Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-
common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes.
Eur. J. Immunol., 15, 168-173

YAKURA, H., F.W. SHEN, E. BOURCET und E.A. BOYSE, 1983

On the function of Ly-5 in the regulation of antigen-
driven B cell differentiation.
J. Exp. Med., 157, 1077-1088

Herrn Prof. Dr. U. Lösch möchte ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. J. Cihak und Frau Dr. I. Schraner für die hilfreiche Einarbeitung und die vorbildliche Betreuung.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Labors, besonders Herrn Dr. Peter Schmidt, Herrn Hans Trainer und Herrn Hermann Ammer, für die stete Hilfsbereitschaft.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Herrn Jürgen Kaiser danke ich für die freundliche Überlassung der Protein Kinase.

L.BENSLAUF

- 5.11.1945 geboren in Los Angeles, California, USA als Sohn von Gerald und Suzanne Tobin, geb. Gerstle
- 1950-1959 Public School in Hewlett, New York, USA
- 1959-1963 High School in Hewlett, New York, USA
- 23.6.1963 High School Diploma
- 1963-1969 Studium an der Cornell Universität
- 1.1969 B.S. in Biochemie von Cornell Universität
- 1970-1975 Angestellter der Cornell Universität
- 1975-1978 Studium an der State University in Cortland, New York
- 5.1978 M.S. in Secondary Science Education von der State University of New York in Cortland
- 1978-1980 High School Lehrer
- 1980-1986 Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
- 21.2.1986 Staatsexamen
- 3.6.1986 Approbation in Florida, USA
- ab Februar 1986 Anfertigung der vorliegenden Dissertation

